

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/052934 A1(51) 国際特許分類⁷: C07K 19/00, C12N 15/62, C12Q 1/37

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015828

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-360744
2002 年 12 月 12 日 (12.12.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 近江谷 克裕 (OHMIYA, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒563-8577 大阪府池田市緑丘 1 丁目 8 番 31 号 独立行政法人産業技術総合研究所関西センター内 Osaka (JP). 芦高 恵美子 (ASHITAKA, Emiko) [JP/JP]; 〒570-8506 大阪府守口市文園町 10-15 関西医科大学医化学講座内 Osaka (JP). 伊藤 誠二 (ITO, Seiji) [JP/JP]; 〒570-8506 大阪府守口市文園町 10-15 関西医科大学医化学講座内 Osaka (JP).

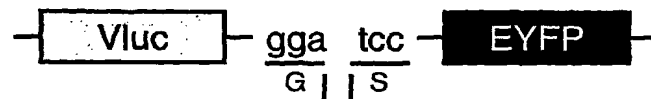
(74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: MONITOR PROTEIN FOR MEASURING PROCESSING OF PROTEIN

(54) 発明の名称: 蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質



(A) Vluc-NST/Noc-EYFP

SEQKQLQ KR FGGFTGG
NST Noc/OFQ

(B) mut-Vluc-NST/Noc-EYFP

SEQKQLQ GG FGGFTG G
NST Noc/OFQ

(C) del-Vluc-NST/Noc-EYFP

SEQKQLQ FGGFTG G
NST Noc/OFQ

(57) Abstract: A monitor protein for measuring processing of a protein comprising a processing region which contains an amino acid residue or an amino acid residue sequence to be processed and a secretory chimeric protein which originates in the stereostructure of a protein containing at least a processing region formed by the processing and shows a change in luminescent and fluorescent properties.

(57) 要約: 本発明は、プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含むプロセッシング領域と、プロセッシングを受けることにより生じる少なくともプロセッシング領域を含む蛋白質の立体構造に起因し発光蛍光エネルギー特性変化を示す分泌型キメラタンパク質とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定するモニター蛋白質に関する。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

蛋白質のプロセッシングを測定するためのモニター蛋白質

技術分野

- 本発明は、プロセッシングによりタンパクが切断される領域と切断によってエネルギー移動特性が変化する特性可変領域を含むモニター蛋白質、それをコードする遺伝子、作成された本モニター蛋白質を用いるプロセッシング細胞や蛋白質、或いはプロセッシングを促進または抑制する化合物のスクリーニングする方法に関する。

背景技術

- 10 遺伝子の転写産物である蛋白質が直接機能を持つ事もあるが、多くの場合、翻訳後産物である蛋白質は糖付加、リン酸化、プロセッシング等の修飾過程を経て活性化される。そのうちプロセッシング過程ではプレプロ蛋白質から任意の場所が切断され活性ペプチドが切り出される。

- プレプロ蛋白質から活性ペプチドが切り出されるプロセッシング過程は、従来、
15 切断後の活性ペプチドに対する特異的な抗体による検出や、電気泳動法やマスペクトル法による直接的な分子量の変化による検出を行ってきた。しかしながら、これらの方法は簡便な方法ではなく、直接的にプロセッシングを観察する手段ではない。

- 発光酵素類は細胞内の遺伝子転写活性を直接観察する手段として有効であり、
20 遺伝子発現検出モニター蛋白質として利用されている。また、蛍光タンパク質は細胞内で発現とほぼ同時期に、補因子を必要とせず、蛍光活性を持つ。細胞内で蛍光活性を指標として蛋白質の局在等に関するモニター蛋白質として利用されている。

- 別個の蛋白質である蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間、或いは発光酵素・蛍光蛋白質
25 間のエネルギー移動を指標として分子間或いは分子内相互作用の変化を追跡する手法が開発され、蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間のエネルギー移動を指標に細胞内のカルシウムイオンの変化や、発光酵素・蛍光蛋白質間エネルギー移動を指標に蛋白質のリン酸化を解析するモニター蛋白質が構築されている。しかしながら、こ

れらエネルギー移動を指標としたプロセッシング過程を可視化、定量化するモニター蛋白質はない。

本発明は、プロセッシング過程を可視化できるモニター蛋白質の作成及び最適化、さらに本モニター蛋白質を用いるプロセッシング酵素に対するスクリーニング
5 グ法、プロセッシング酵素活性を抑制或いは促進する薬剤に対するスクリーニング法を開発し病態の治療、検査及び新薬開発に利用することを目的とする。

図面の簡単な説明

図 1 は、エネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質にプロセッシング部位
(A)、及びその部位を変異 (B) 或いは欠損 (C) させた領域を挿入した構築
10 物を示す。

図 2 は、エネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質にプロセッシング部位
(A)、及びその部位を変異 (B) 或いは欠損 (C) させた領域の DNA 配列を示す。

図 3 は、プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質を導入した細
15 胞内、及び細胞外でのウエスタンブロット解析及びプロセッシング酵素を導入した
場合の切断効率の変化の検出結果を示す。

図 4 は、プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質を発現する細胞
にプロセッシング酵素を導入した場合、エネルギー移動効率、スペクトルが変
化することを示す。(a) Vluc-NST/Nco-EYFP 単独、(b) Vluc-NST/Nco-EYFP に PC1
20 を発現、(c) Vluc-NST/Nco-EYFP に PC2 を発現、(d) Vluc。

図 5 は、プロセッシング配列を挿入した分泌型キメラタンパク質のエネルギー
移動効率は切断酵素 PC1 により大きく減少し、同様に切断効率をウエスタンブ
ロットの結果より定量化した結果を示す。

発明の開示

エネルギー移動可能な発光酵素・蛍光蛋白質間にプロセッシング領域を挿入した
モニター蛋白質構築物が作られれば、プロセッシングの前後でエネルギー移動
は変化し、それに伴い発光スペクトルは変化する。このスペクトル変化を指標に、
プロセッシング後活性ペプチドの定量化、プロセッシング酵素活性の定量化及び

プロセッシング場の局在解析、さらにはプロセッシング酵素活性を制御する遺伝子や蛋白質をスクリーニングでき、プロセッシングを指標とした各種病態の治療及び新薬開発（プロセッシングの促進または阻害作用を有する薬物の開発）への利用が可能となる。

- 5 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、プロセッシングによる切断を受けるプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることにより発光蛍光エネルギー特性変化を示す特性可変領域を持つモニター蛋白質を作成した。

本発明は、以下のモニター蛋白質、それをコードする遺伝子、作成された本モニター蛋白質を用いるプロセッシング細胞や蛋白質、或いはプロセッシングを促進または抑制する化合物のスクリーニングする方法に関する。

1. プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含む1以上のプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることによりエネルギー移動特性変化を示す1以上の特性可変領域とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定可能なモニター蛋白質。
2. 特性可変領域が発光蛋白質と蛍光蛋白質を含む、項1に記載のモニター蛋白質。
3. モニター蛋白質が分泌タンパク質である項1に記載のモニター蛋白質。
4. プロセッシング切断領域を切断するプロセッシング酵素が、PC1、PC2、フリ
20 ン、プロテアソーム、カテプシンおよびトロンピンからなる群から選ばれるいずれかである項1に記載のモニター蛋白質。
5. プロセッシング酵素がPC1である項4に記載のモニター蛋白質。
6. プロセッシング切断領域が、特性可変領域を構成する発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に位置する、項1に記載のモニター蛋白質。
- 25 7. 発光蛋白質が、ウミボタル、ヒオドシエビ、発光昆虫（ホタル、ヒカリコメツキなど）、発光性渦鞭毛藻、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケおよびオワンクラゲ（エクオリン）からなる群から選ばれるいずれかに由来のルシフェラーゼである、項1に記載のモニター蛋白質。

8. 蛍光蛋白質が、グリーン蛍光蛋白質 (GFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP)、青色蛍光蛋白質 (BFP)、シアン蛍光蛋白質 (CFP)、DsRED および赤色蛍光蛋白質 (RFP) からなる群から選ばれるいずれかに由来の蛋白質である、項 1 に記載のモニター蛋白質。
- 5 9. 特性可変領域の発光蛋白質が、分泌型ウミボタル (*Cypridina noctiluca*) 発光酵素であり、特性可変領域の蛍光蛋白質が、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来変異体の黄色蛍光タンパクとからなることを特徴とする、項 2 に記載のモニター蛋白質。
- 10 10. プロセッシング切断領域が、プロセッシング酵素による切断点を含む 6 ~ 100 個のアミノ酸配列からなる項 1 に記載のモニター蛋白質。
11. 以下の a) および b) のいずれかのアミノ酸配列を有する項 1 に記載のモニタータンパク質：
- a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列によって表わされるモニタータンパク質；
- b) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が置換、付
- 15 加、欠失または挿入され、発光蛋白質と蛍光蛋白質の間のエネルギー移動特性と、プロセッシング切断領域におけるプロセッシング酵素による切断活性が保持されているモニター蛋白質。
12. プロセッシング切断領域が SEQ KQLQKRFGGFTGG である、項 1 に記載のモニター蛋白質。
- 20 13. 項 1 ~ 12 のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする DNA。
14. 以下 c) ~ d) のいずれかの DNA 配列を有する項 13 に記載の DNA。
- c) 配列番号 1 記載に塩基配列により表わされる DNA；
- d) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、該 DNA がコードす
- 25 るタンパク質が発光蛋白質と蛍光蛋白質の間のエネルギー移動特性と、プロセッシング切断領域におけるプロセッシング酵素による切断活性が保持されている DNA。
15. 項 13 に記載の DNA を含む発現ベクター。

16. 項1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質、項13～14に記載のDNA、および項15に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価することを特徴とする、該細胞のプロセッシング能を測定する方法。

5 17. 前記細胞がヒト由来の細胞である項16に記載の方法。

18. 被験蛋白質と項1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質と反応させ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定する工程を含む、被験蛋白質のプロセッシング能を測定する方法。

19. プロセッシング酵素をスクリーニングする方法であって、被験蛋白質と項
10 1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程；被験蛋白質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法。

20. プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに項1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

21. プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、項1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質、項13～
20 14に記載のDNA配列、および項15に記載の発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

さらに、本願明細書は、以下の発明を開示する。

25 1. 以下の1)～4)に示す蛋白質

- 1) 配列番号2記載のアミノ酸配列によって表わされるモニタータンパク質；
- 2) 配列番号2記載のアミノ酸配列において、プロセッシングにより切断を受ける領域とそれに伴う特性可変領域（発光蛋白質と蛍光蛋白質）のいずれかの配列または位置が変更されたモニター蛋白質。

- 3) 配列番号2記載のアミノ酸配列の下線部により図示されるプロセッシング切断領域（プレプロノシスタチン蛋白質の切断点を含む18残基のアミノ酸配列）が、プロセッシング切断部位を含む前後10～100アミノ酸残基、好ましくは20～40アミノ酸残基で置換されてなるモニタータンパク質
- 5 4) 特性可変領域が、プロセッシング切断領域の前／後において3次元立体構造が変化することを起因として特性が可変する領域であるモニタータンパク質。プロセッシング領域を挟んで発光蛋白質、蛍光蛋白質を配しプロセッシングの前後で発光蛋白質から蛍光蛋白質にエネルギー移動が成立しなくなり、発光色が変化するモニター蛋白質は好適である。
- 10 好ましい実施形態において、モニター蛋白質は特性可変領域の両端にそれぞれ発光蛋白質、蛍光蛋白質を配した。モニター蛋白質において、いずれがN末端側にあってもよいが、N末端側から発光蛋白質－蛍光蛋白質の順序であるのがより好ましい。発光蛋白質と蛍光蛋白質を有するモニター蛋白質において、プロセッシングが起きない状況では、発光蛋白質（分泌型ウミボタル（Cypridina
- 15 noctiluca）発光酵素）の発する青色光は蛍光蛋白質変異体（EYFP）にエネルギー移動しモニター蛋白質は黄緑色光を発するが、プロセッシングが起きた場合、エネルギー移動は成立せず、モニター蛋白質より青色光のみを発する。この特性可変領域における発光色変化を指標としてプロセッシングを解析できる。
- 従来、細胞内のリン酸化やカルシウムの動態を観察できるモニター蛋白質はあ
- 20 るが、プロセッシング過程を可視化、定量化できるモニター蛋白質は本発明者が初めて明らかにした。また、蛍光蛋白質・蛍光蛋白質間の、或いは発光蛋白質・蛍光蛋白質間のエネルギー移動の変化を指標として細胞機能を解析するシステムも考案されているが、プロセッシングを解析するシステムへの利用は、本研究者が初めてである。
- 25 以下、本発明をより詳細に説明する。
- 本発明のモニター蛋白質は、プロセッシング切断領域と、特性可変領域とを含む点に特徴を有する。

プロセッシング切断領域とは、プロセッシング酵素により切断を受ける 2 以上のアミノ酸を含む領域であり、モニター対象となるプロセッシング酵素の種類によりそのアミノ酸配列は変化する。

本発明において、プロセッシング切断領域とは、プロセッシング酵素により認識・切断可能なアミノ酸配列を含む領域であり、1 以上のアミノ酸を含み、モニター対象となるプロセッシング酵素の種類によりそのアミノ酸配列は変化する。例えば配列番号 2 に示されるモニター蛋白質において、プロセッシング酵素である P C 1 は切断点「K R」を認識して切断するが、配列番号 2 には 4 個の「K R」（ルシフェラーゼ部分に 2 個、プロセッシング切断領域に 1 個、Y F P に 1 10 個）があるにもかかわらず、切断はプロセッシング切断領域のみで起こる。従って、プロセッシング切断領域は、切断点（K R）のみならず該切断点を酵素が認識し切断可能とするための補助的部分を有し、切断にほとんど或いは全く影響しない追加の配列をさらに含んでいてもよい。プロセッシング切断領域の一例としては、プロセッシング酵素（P C 1）に対する「S E Q K Q L Q K R F G G F T 15 G G」が挙げられる。

プロセッシング切断領域を、プロセッシング酵素として P C 1 を例に取り説明する。

P C 1 の切断認識配列は、Lys-Arg であり、プロセッシング切断領域は Lys-Arg を含み、さらにその C 末端側及び N 末端側に 3 ～ 5 0 個、好ましくは 4 ～ 4 0 個、20 更に好ましくは 5 ～ 2 0 個のアミノ酸を連結してプロセッシング切断領域とすることができる。プロセッシング切断領域に用いられるアミノ酸は、Gly, Ala, His, Arg, Lys, Ser, Cys（シスチンを含む）, Thr, Met, Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Gln, Asp, Pro などの蛋白質を構成する通常のアミノ酸が好ましいが、Sar、 β -アラニン、ノルバリン、オルニチン、システイン酸などの他の天 25 然或いは合成のアミノ酸であってもよい。

上記は、プロセッシング酵素が P C 1 の場合であり、他のプロセッシング酵素に対するプロセッシング切断領域も同様にしてデザインすることができる。

切断領域の全アミノ酸数は、6 ～ 1 0 0 個程度、好ましくは 8 ～ 5 0 個程度、更に好ましくは 1 0 ～ 4 0 個程度である。

プロセッシング酵素は、生体内で合成された蛋白質前駆体を限定分解し、成熟体蛋白質に変換する酵素であれば特に限定されず、例えばPC1、PC2、フリリン、プロテアソーム、カテプシン、トロンピンが例示される。

PC1以外のプロセッシング酵素と切断領域を以下に例示する。

5

表 1

プロセッシング酵素	プロセッシング切断点のアミノ酸配列の例
PC1	KR↓
PC2	KR↓
フリリン	RRKR↓
プロテアソーム	KM↓
カテプシン	KM↓
トロンピン	LVPR↓

例えば、PC1、PC2、フリリンは、いずれもKRのC末端側蛋白質を切断するが、KRの前後の配列或いは全体としての蛋白質の構造を変化させることにより、特定のプロセッシング酵素により切断させることが可能になる。

モニター対象となるプロセッシング酵素が1つの場合、1つの切断認識配列を含めばよいが、複数のプロセッシング酵素を同時にモニターする場合、2種以上のプロセッシング酵素に各々対応する、異なる切断認識配列を切断領域に導入することも可能である。また、特定のプロセッシング酵素の切断認識配列のみを有し、他のプロセッシング酵素の切断認識配列を有しない切断領域を構築することにより、特定のプロセッシング酵素活性のみを調節する化合物をスクリーニング
15 することができる。また、複数の基質に対して作用する1つのプロセッシング酵素を対象とした場合であっても、切断認識配列及びその前後の配列を例えば特定の基質の配列に合わせて適切に選択することにより、特定の基質のみのプロセッシングを促進または抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

特性可変領域は、プロセッシング酵素により切断された場合に、そのエネルギー移動特性が変化するものであればよく、例えば発光蛋白質と蛍光蛋白質、発光蛋白質と着色蛋白質などの組み合わせを含むことができる。

発光蛋白質と蛍光蛋白質をプロセッシング切断領域を介して連結した場合、プロセッシング切断領域が切断される前では発光蛋白質から蛍光蛋白質へのエネルギー

20

ギー移動が起きるが、切断後にはこのエネルギー移動が起きなくなり、切断の有無をエネルギー移動の測定により容易に定量できる利点がある。発光蛋白質と蛍光蛋白質並びにプロセッシング切断領域は、発光蛋白質ープロセッシング切断領域ー蛍光蛋白質の順に連結するのが好ましいが、プロセッシング酵素による切断
5 により発光蛍光特性が変化する限り、蛍光蛋白質ープロセッシング切断領域ー発光蛋白質の順序で連結してもよい。

また、発光蛋白質の発光特性に重大な影響を有しない部位にプロセッシング切断領域を導入してもよい。この場合、発光蛋白質は、プロセッシング後に発光特性を失ってもよい。

- 10 同様に、蛍光蛋白質の蛍光特性に重大な影響を有しない部位にプロセッシング切断領域を導入してもよい。この場合、蛍光蛋白質は、プロセッシング後に蛍光特性を失ってもよい。

発光蛋白質としては、ウミボタル、ヒオドシエビ、発光昆虫（ホタル、ヒカリコメツキなど）、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケ、オワンクラゲ（エクオリン）などの各種発光生物由来のルシフェラーゼが例示される。例えば、ウミボタル・ルシフェラーゼは分泌型であるので、これを用いるとモニター蛋白質が分泌型となり好ましい。分泌型モニター蛋白質を使用すれば、生きた細胞内で起きているプロセッシングの程度を、細胞を破壊することなく評価できるためである。
15 ウミシイタケ由来のルシフェラーゼのように非分泌型ルシフェラーゼの場合には、
20 N末端側に分泌タンパク質を導入し、分泌型発光蛋白質として利用することもできる。

蛍光蛋白質としては、グリーン蛍光蛋白質（GFP）、黄色蛍光蛋白質（YFP）、青色蛍光蛋白質（BFP）、シアン蛍光蛋白質（CFP）、DsRED、赤色蛍光蛋白質（RFP）などが例示される。また、着色蛋白質として青色着色蛋白質（フィコシアニン）、
25 シアニン）、紅色着色蛋白質（フィコエリトリン）が例示される。フィコシアニンとフィコエリトリンは、ホタルルシフェラーゼの光を吸収することができる。

本発明の蛍光蛋白質は、生物発光タンパク質から放出される光が蛍光蛋白質の励起波長になるように選択される。このような組み合わせとしては、例えば以下のものが挙げられる。

表 2

生物発光タンパク質	蛍光蛋白質または着色蛋白質
ウミボタル・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、
ホタル・ルシフェラーゼ	DsRED、フィコシアニン、フィコエリトリン
発光性渦鞭毛藻・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
ヒカリコメツキ・ルシフェラーゼ	DsRED
ウミシイタケ・ルシフェラーゼ	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP
エクオリン	GFP、YFP、BFP、CFP、DsRED、RFP、

好ましい1つの実施形態において、本発明のモニタータンパクは、以下の1)－3)に示す蛋白質が例示される。

- 1) 配列番号2記載のアミノ酸配列によって表わされるモニタータンパク質。
- 5 2) 配列番号2記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列より表わされ、且つ発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質。
- 3) 配列番号1記載の塩基配列により表わされるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードするタンパクであって、発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有するモニター蛋白質。

2) のタンパクは、1) のタンパクに発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を失わない程度の変異が導入されたタンパクである。このような変異は、自然界において生じるほかに、人為的な変異も含む。人為的な変異を生じさせる手段としては、部位特異的な変異誘導法 (Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982) などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、分泌、発光、蛍光活性及びエネルギー移動特性が失われない限り、その個数は制限されないが、通常は20アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好まし

くは5アミノ酸以内である。変異を導入したタンパクが発光・蛍光活性を維持しているかは、そのタンパクの発光・蛍光活性を調べることによって判定できる。

3) のタンパクは、DNA 同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する
5 モニター蛋白質である。3) のタンパクにおける「ストリンジントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、
「1xSSC, 0.1%SDS, 37°C」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42°C」程度であり、更に好ましくは「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65°C」程度である。ハイブリダイゼーションによって得られる DNA は配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる
10 DNA と通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは 75%以上の相同性、更に好ましくは 90%以上の相同性を指す。

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、
15 例えば、pBT-VL-b-YFP などを用いることができ、宿主細胞としては大腸菌 BL21 株などを用いることができる。

本発明の遺伝子は、以下 1) -2) に示す遺伝子を包含する。

- 1) 配列番号 1 記載に塩基配列により表わされる遺伝子。
- 2) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA
20 とストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA がコードする DNA 配列。

上記の DNA がコードするタンパクは、DNA 同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる分泌型発光酵素活性、蛍光蛋白質活性及びエネルギー移動活性を有する蛋白質である。

- 25 本明細書において「ストリンジントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1xSSC, 0.1%SDS, 37°C」程度であり、好ましくは「0.5xSSC, 0.1%SDS, 42°C」程度であり、更に好ましくは
「0.2xSSC, 0.1%SDS, 65°C」程度である。ハイブリダイゼーションによって得られ

る DNA は配列番号 1 または 2 記載の塩基配列により表わされる DNA と通常高い相同性を有する。高い相同性とは、60%以上の相同性、好ましくは 75%以上の相同性、更に好ましくは 90%以上の相同性、特に 95%以上の相同性を指す。

本発明のタンパクは、後述する本発明の遺伝子を発現ベクターに組み込み、適
5 当な宿主細胞内で発現させることにより得ることができる。発現ベクターとして、例えば、pBT-VL-mp-YFP (VL はウミボタル・ルシフェラーゼ、mp はモニターペプチド、YFP は黄色蛍光蛋白質をそれぞれ示す) などを用いることができ、宿主細胞としては哺乳動物細胞、酵母などの真核生物細胞、大腸菌、枯草菌、藻類、真菌類などの原核生物細胞が挙げられ、そのいずれを用いてもよい。好ましい宿
10 主細胞としては、哺乳動物培養細胞 COS 7 細胞株 (この系では哺乳類系のタンパク合成、タンパク修飾過程を経ることが重要であり、つまり、この過程をモニタリングする) などを用いることができる。

本発明の好ましいキメラタンパク質をコードする遺伝子 (ポリヌクレオチド) は、

- 1) 配列番号 1 記載の塩基配列を有する遺伝子。
- 15 2) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を有する遺伝子である。

(スクリーニング方法 I)

本発明のモニター蛋白質、DNA 配列又は発現ベクターのいずれかをある特定の
20 細胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価する。

該方法により、細胞のプロセッシング能を定量的に評価することが可能になる。

(スクリーニング方法 II)

被験蛋白質と本発明のモニター蛋白質と反応させ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定することで、被験蛋白質のプロセッシング能を定量的に
25 測定する。

該方法において、通常モニター蛋白質は複数用意し、被験蛋白質がどのモニター蛋白質のエネルギー移動特性を変化させるかを測定することにより、被験蛋白質がどのようなプロセッシング酵素であるのか、どのプロセッシング酵素の活性が強いのかなどを定量的に測定することができる。

(スクリーニング方法 I I I)

被験蛋白質と本発明のモニター蛋白質とを反応させる工程；被験蛋白質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程を行うことにより、新たなプロセッシング酵素をスクリーニングすることができる。

(スクリーニング方法 I V)

細胞フリーの系でプロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに本発明のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む。

該方法により、細胞内への移行性などの要因を考慮することなく、プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングすることができる。

プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、本発明のモニター蛋白質、該モニター蛋白質をコードする DNA 配列、および該 DNA 配列を含む発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む。

該方法により、経口投与等により血液中に移行させることにより薬効を発揮する化合物をスクリーニングすることができる。

本発明は、新規のプロセッシングを定量化できるモニター蛋白質及びそれをコードする遺伝子、本酵素の発現を制御する遺伝子を提供する。本モニタータンパク質を使用することで、細胞を破壊することなく細胞内で起きるプロセッシング過程を可視化できる。これらは病態の治療、検査及び新薬開発に利用が可能である。

次に、本発明を実施例を挙げてさらに詳細に説明する。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。

実施例 1

ノシスタチンとノシセプチンは同一のプレプロタンパク質よりプロセッシング過程で、切断酵素により切り出されるホルモンペプチドであり、生体内で痛みが伝わった場合、相反する効果を制御することが知られている。発光・蛍光タンパク質間でエネルギー移動可能な分泌型キメラタンパク質の挿入部位にプロセッシングされるノシスタチン（図中で NST と標記）、ノシセプチン（図中で Noc と標記）ペプチド配列（図 1 (A)）を挿入したモニタータンパク質を、併せて、切断認識に必須、且つ切断される Lys - Arg を Gly-Gly（図 1 (B)）に変異させたペプチド配列に、及び欠損させたペプチド配列（図 1 (C)）にしたモニタータンパク質を

5 作成した。それぞれを Vluc-NST/Noc-EYFP、mut-Vluc-NST/Noc-EYFP 及び del-Vluc-NST/Noc-EYFP とした。作成法として、モニタータンパク質の挿入制限酵素部位である BamHI 部位を切断後、図 2 に示した DNA 配列を化学合成したものをリガーゼ反応により結合させた。挿入されたことは DNA 配列によって確認した。

15 実施例 2

神経細胞由来 NG108-15 に 3 つのモニタータンパク質 Vluc-NST/Noc-EYFP、mut-Vluc-NST/Noc-EYFP 及び del-Vluc-NST/Noc-EYFP を含む遺伝子ベクターを、市販の導入試薬を用いて導入した。培養液中に分泌されたタンパク質をウエスタンブロット法により解析した（図 3）。コントロールとして挿入配列を持たない

20 Vluc- EYFP を用いた。抗ウミボタルルシフェラーゼ抗体（anti-Vluc）はモニタータンパク質の N 末端側の発光酵素を認識できる抗体であり、4 つのモニタータンパク質ともに 95 kDa の分子量である。また、抗緑色蛍光タンパク質抗体（anti-GFP）はモニタータンパク質の C 末端側の蛍光タンパク質を認識できる抗体であり、4 つのモニタータンパク質ともにメインタンパク質として 95 kDa の分

25 子量を示している。しかしながら Vluc-NST/Noc-EYFP のモニタータンパク質では、95 kDa に比べてわずかではあるが 27 kDa にバンドが確認できた。神経細胞由来 NG108-15 にはプロセッシング酵素が発現しており、このバンドはモニタータンパク質が切断を受け、切断された後の C 末端側の EYFP を認識したものである。また、変異及び欠損を加えた 2 つの mut-Vluc-NST/Noc-EYFP 、 del-Vluc-NST/Noc-EYFP

ではこの 27 kDa バンドは検出できず、プロセッシング酵素は挿入されたアミノ酸配列を厳密に認識できることが明らかとなった。但し、anti-GFP 抗体で認識できる 68 kDa のバンドは人為的なものと思われる。さらに、Vluc-NST/Noc-EYFP のモニタータンパク質で起きる切断が、インシュリンやエンケファリンなどを切断、

5 産生する代表的なプロセッシング酵素である PC1 や PC2 のどちらの作用によるのかを明らかにするため、PC1 と PC2 をモニタータンパク質に導入した細胞に強制発現させた。その結果、PC1 では 27 kDa バンドが 95 kDa バンドに比べて著しく増加するが、PC2 ではほとんど変化しないことが明らかとなった。この結果、ノシスタチン・ノシセプチン (NST/Noc) 間で起きるプロセッシングが PC1 によるこ

10 とを世界で始めて明らかにした。

実施例 3

神経細胞由来 NG108-15 にモニタータンパク質 Vluc-NST/Noc-EYFP 及び Vluc を含む遺伝子ベクターを、市販の導入試薬を用いて導入した。併せてモニタータン

15 パク質 Vluc-NST/Noc-EYFP を発現する細胞にプロセッシング酵素 PC1 或いは PC2 を強制発現させた。この 4 種類の細胞より分泌された培養液の発光スペクトルを測定した (図 4)。モニタータンパク質 Vluc-NST/Noc-EYFP では Vluc 単独の発光スペクトルと一致する 460nm の他にモニタータンパク質内で起きるエネルギー移動に起因した 525nm のピークが観測できる。このモニタータンパク質 Vluc-

20 NST/Noc-EYFP にプロセッシング酵素 PC1 或いは PC2 を発現させた細胞の培養液では PC2 を加えた場合は変化しないが、PC1 を発現させた場合、525nm のピークが減少する。これはウエスタンブロット法の結果から明らかなようにプロセッシング酵素 PC1 がモニタータンパク質 Vluc-NST/Noc-EYFP を切断し、モニタータンパク質内のエネルギー移動が起きなくなったことを表わしている。つまり培養液の発

25 光スペクトルを測定することで、生きた細胞内で起きているプロセッシングの程度を、細胞を破壊することなく評価できる。

実施例 4

- 神経細胞由来 NG108-15 に導入したモニタータンパク質 V_{luc}-NST/Noc-EYFP の切断効率を、ウエスタンブロット法により検出し画像解析より非切断タンパク質量を定量化した (図 5B)。また、モニタータンパク質 V_{luc}-NST/Noc-EYFP と V_{lu} 単独の発光スペクトルを比較した差スペクトルを求め (図 4 のスペクトルの内図)、
- 5 スペクトルの面積をエネルギー移動効果 (BRET シグナル) として評価した (図 5A)。モニタータンパク質 V_{luc}-NST/Noc-EYFP 及びモニタータンパク質 V_{luc}-NST/Noc-EYFP に PC2 を導入した場合、非切断タンパク質量と BRET シグナル共に切断が起きていないことを、一方、モニタータンパク質 V_{luc}-NST/Noc-EYFP に PC
- 1 を導入した場合、モニタータンパク質がおよそ 60% 切断されていることを、非
- 10 切断タンパク質量と BRET シグナル共に示している。これは、細胞内で起きているプロセッシングの効率を直接電気泳動のような方法で定量しなくても、培養液の発光スペクトルを測定することで、瞬時に評価できることが明らかとなった。

請求の範囲

1. プロセッシングを受けるアミノ酸残基又はアミノ酸残基配列を含む1以上のプロセッシング切断領域と、プロセッシングを受けることによりエネルギー移動特性変化を示す1以上の特性可変領域とを含む、蛋白質のプロセッシングを測定可能なモニター蛋白質。
2. 特性可変領域が発光蛋白質と蛍光蛋白質を含む、請求項1に記載のモニター蛋白質。
3. モニター蛋白質が分泌タンパク質である請求項1に記載のモニター蛋白質。
4. プロセッシング切断領域を切断するプロセッシング酵素が、PC1、PC2、フリン、プロテアソーム、カテプシンおよびトロンビンからなる群から選ばれるいずれかである請求項1に記載のモニター蛋白質。
5. プロセッシング酵素がPC1である請求項4に記載のモニター蛋白質。
6. プロセッシング切断領域が、特性可変領域を構成する発光蛋白質と蛍光蛋白質の間に位置する、請求項1に記載のモニター蛋白質。
7. 発光蛋白質が、ウミボタル、ヒオドシエビ、発光昆虫（ホタル、ヒカリコメツキ）、発光性渦鞭毛藻、発光ミミズ、ラチア、ウミシイタケおよびオワンクラゲ（エクオリン）からなる群から選ばれるいずれかに由来のルシフェラーゼである、請求項1に記載のモニター蛋白質。
8. 蛍光蛋白質が、グリーン蛍光蛋白質（GFP）、黄色蛍光蛋白質（YFP）、青色蛍光蛋白質（BFP）、シアン蛍光蛋白質（CFP）、DsRED および赤色蛍光蛋白質（RFP）からなる群から選ばれるいずれかに由来の蛋白質である、請求項1に記載のモニター蛋白質。
9. 特性可変領域の発光蛋白質が、分泌型ウミボタル（*Cypridina noctiluca*）発光酵素であり、特性可変領域の蛍光蛋白質が、発光オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来変異体の黄色蛍光タンパクとからなることを特徴とする、請求項2に記載のモニター蛋白質。
10. プロセッシング切断領域が、プロセッシング酵素による切断点を含む6～100個のアミノ酸配列からなる請求項1に記載のモニター蛋白質。

1 1. 以下の a) および b) のいずれかのアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のモニタータンパク質:

a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列によって表わされるモニタータンパク質;

b) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において、1 または複数のアミノ酸が置換、付
5 加、欠失または挿入され、発光蛋白質と蛍光蛋白質の間のエネルギー移動特性と、
プロセッシング切断領域におけるプロセッシング酵素による切断活性が保持され
ているモニター蛋白質。

1 2. プロセッシング切断領域が SEQKQLQKRFGGFTGG である、請求
項 1 に記載のモニター蛋白質。

10 1 3. 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のモニター蛋白質をコードする DNA。

1 4. 以下 c) - d) のいずれかの DNA 配列を有する請求項 1 3 に記載の DNA。

c) 配列番号 1 記載に塩基配列により表わされる DNA;

d) 配列番号 1 記載の塩基配列により表わされる DNA 又はそれと相補的な DNA とス
15 トリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA であって、該 DNA がコードす
るタンパク質が発光蛋白質と蛍光蛋白質の間のエネルギー移動特性と、プロセッ
シング切断領域におけるプロセッシング酵素による切断活性が保持されている
DNA。

1 5. 請求項 1 3 に記載の DNA を含む発現ベクター。

1 6. 請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のモニター蛋白質、請求項 1 3 ~ 1 4 に
20 記載の DNA、および請求項 1 5 に記載の発現ベクターのいずれかをある特定の細
胞に導入し、モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を定量的に評価すること
を特徴とする、該細胞のプロセッシング能を測定する方法。

1 7. 前記細胞がヒト由来の細胞である請求項 1 6 に記載の方法。

1 8. 被験蛋白質と請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のモニター蛋白質と反応さ
25 せ、該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定する工程を含む、被験蛋
白質のプロセッシング能を測定する方法。

1 9. プロセッシング酵素をスクリーニングする方法であって、被験蛋白質と請
求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載のモニター蛋白質とを反応させる工程; 被験蛋白

質との反応の前後における該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して該モニター蛋白質の特性を変化させる被験蛋白質を選択する工程、を含む方法。

20. プロセッシングを促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、被験試料とプロセッシング酵素並びに請求項1～12のいずれかに記載
5 のモニター蛋白質とを接触させる工程；被験試料の接触の前後での該モニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

21. プロセッシング（酵素活性）を促進或いは抑制する化合物をスクリーニングする方法であって、請求項1～12のいずれかに記載のモニター蛋白質、請求
10 項13～14に記載のDNA配列、および請求項15に記載の発現ベクターのいずれかが導入された細胞を調製する工程；被験試料の存在下及び非存在下で、該細胞で発現されたモニター蛋白質のエネルギー移動特性変化を測定して、該特性変化を促進または抑制する試料を選択する工程、を含む方法。

1 / 5
F i g . 1

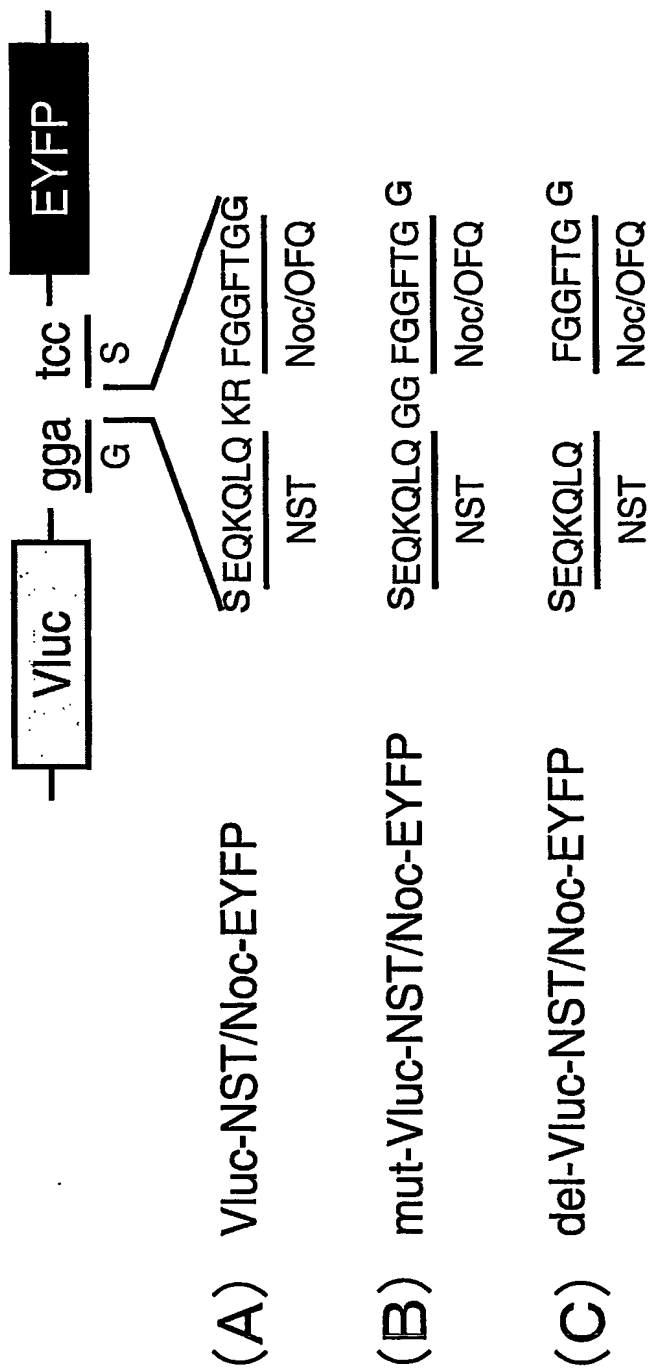
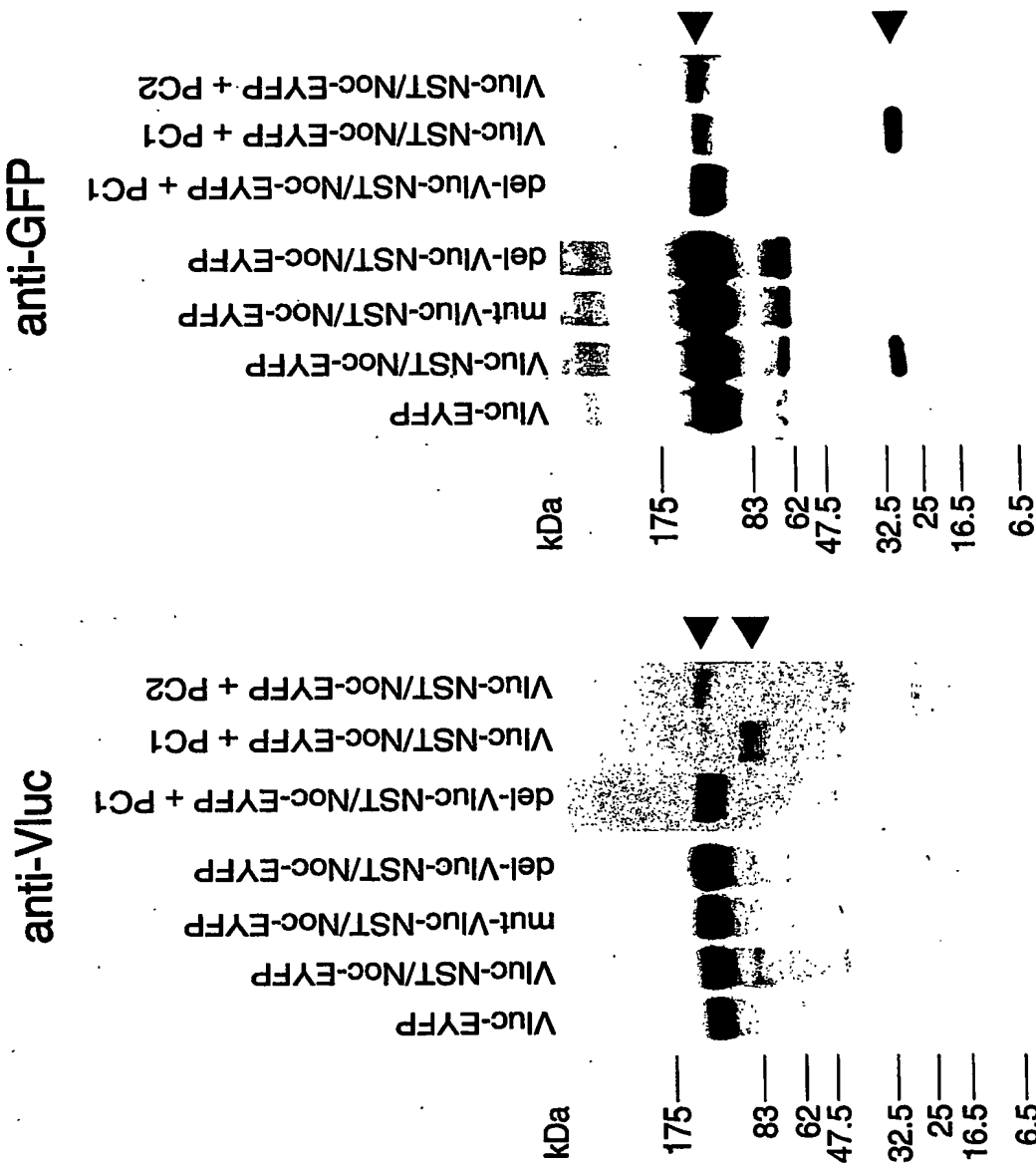


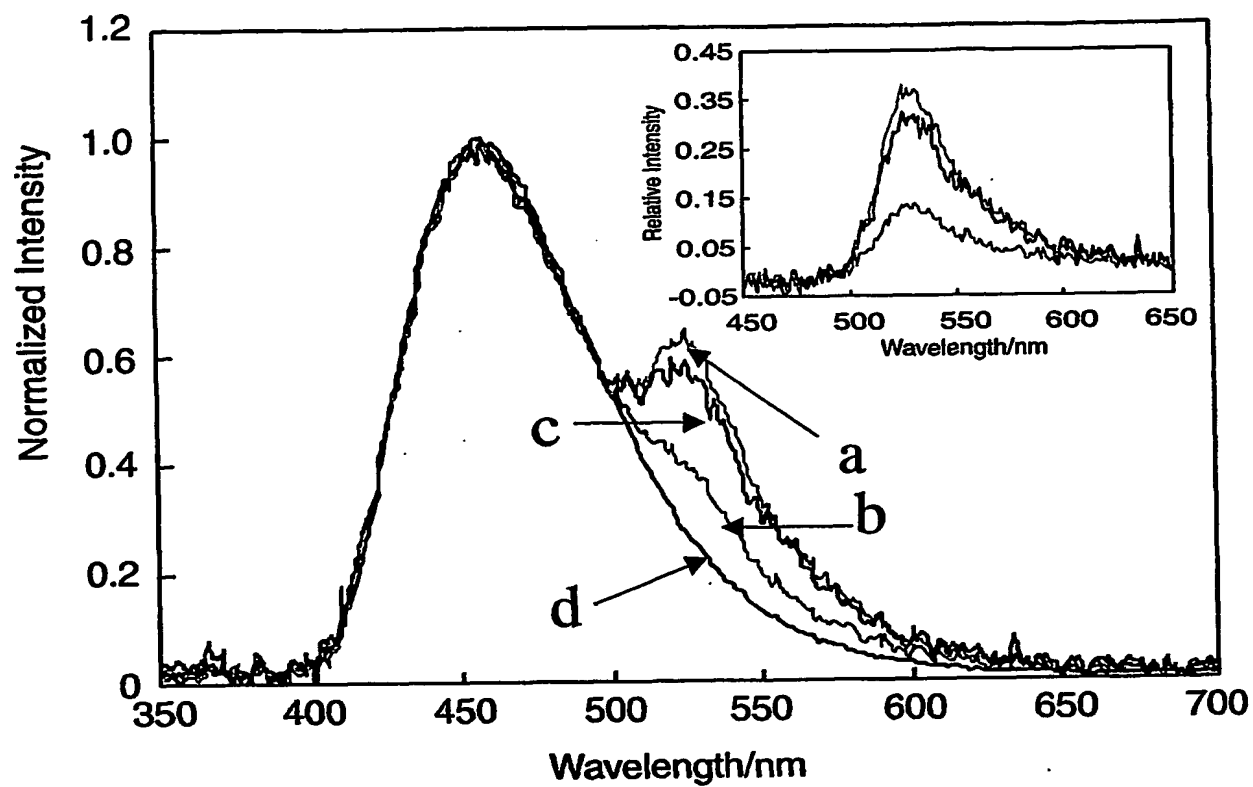
Fig. 2

- (A)
- GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGAACGGGTCGGGGGCTTCACCGGG
 GCTCGTCTTTGTGACGCTTCGCCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnLysArgPheGlyGlyPheThrGlyGlySer
- (B)
- GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGGGGGGGTTCGGGGGCTTCACCGGG
 GCTCGTCTTTGTGACGCTCCCCCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnGlyGlyPheGlyGlyPheThrGlyGlySer
- (C)
- GATCCGAGCAGAAACAGCTGCAGTTCGGGGGCTTCACCGGG
 GCTCGTCTTTGTGACGCTCAAGCCCCCGAAGTGGCCCGATC
GlySerGluGlnLysGlnLeuGlnPheGlyGlyPheThrGlyGlySer

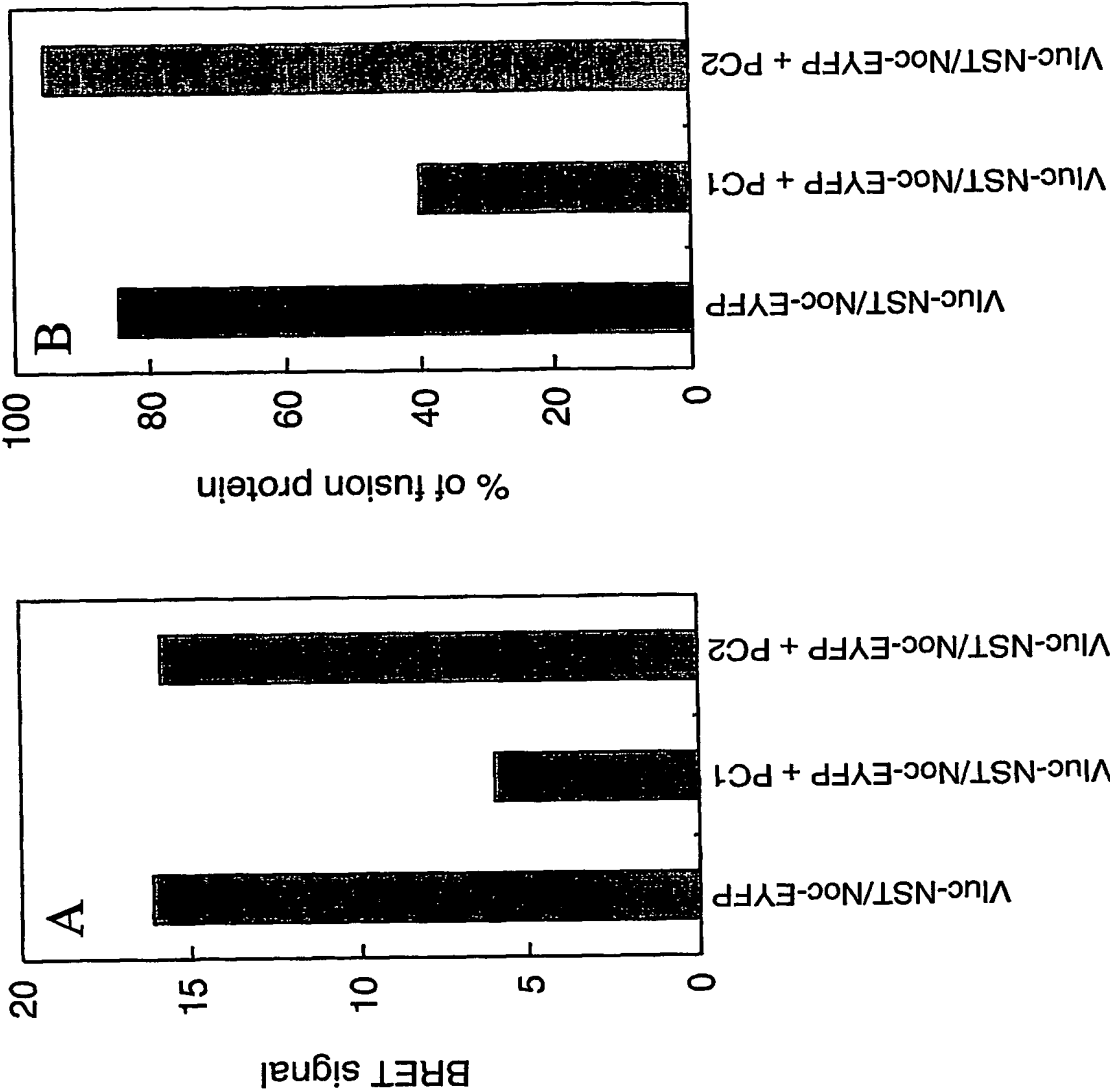
3 / 5
F i g . 3



4 / 5
F i g . 4



5 / 5
F i g . 5



1/10

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

<120> Monitor protein for measuring protein processing

<130> P03-133

<150> JP2002-360744

<151> 2002-12-12

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2502

<212> DNA

<213> mammalian

<400> 1

atgaagataa taattctgtc tggttatattg gcctactgtg tcaccgacaa ctgtcaagat	60
gcatgtcctg tagaagcgga accgccatca agtacaccaa cagttccaac ttcttgtgaa	120
gctaaagaag gagaatgtat agataccaga tgcgcaacat gtaaacgaga tatactatca	180
gatggactgt gtgaaaataa accaggggaag acatgctgta gaatgtgcoa gtatgtgatt	240
gaatgcagag tagaagcago tggttatittt agaacgtttt acggcaaaag atttaatttt	300
caggaacctg gtaaatatgt gctggctagg ggaaccaagg gtggcgattg gtctgtaaco	360
ctcaccatgg agaattctaga tggacagaag ggagctgtgc tgactaagac aacctggag	420

2/10

gttgaggag acgtaataga cattactcaa gctactgcag atcctatcac agttaacgga 480

ggagctgacc cagttatcgc taaccggttc acaattgggtg aggtgaccat tgctgttggt 540

gaaataccgg gcttcaatat cacagtcctc gaattottta aactaatcgt gatgatatt 600

ctgggaggaa gatctgtgag aattgctcca gacacagcaa acaaaggact gatctctggt 660

atctgtggta atctggagat gaatgacgct gatgacttta ctacagatgc agatcagctg 720

gcgatccaac coaacataaa caaagagttc gacggctgcc cattotatgg caatccttct 780

gatatcgaat actgcaaagg tctgatggag ccatacagag ctgtatgtcg taacaatato 840

aacttctact attacaotot atcctgtgcc ttcgcttact gtatgggagg agaagaaaga 900

gctaaacacg tcottttoga ctatgttgag acatgcgctg cgccggaaac gagaggaacg 960

tgtgttttat caggacatac tttotatgac acattcgaca aagcaagata tcaattccag 1020

ggcccatgca aggagattct gatggccgca gactgttact ggaacacatg ggatgtaaag 1080

gtttcacata gagacgtoga atcatatact gaggtagaga aagtaacaat caggaaacag 1140

tcaactgtag tagatctcat tgtggatggc aagcaggtca aggttggagg agtggatgta 1200

tctatccogt acagctctga gaacaottoc atatactggc aggatggaga catcctgacg 1260

aoggocatcc taactgaago tcttgtcgtt aagttcaact ttaagcagct cottgtagtt 1320

catatcagag atocattcga tggaaagaca tgcggcatat gtggttaact taatcaagat 1380

tcaactgatg atttctttga cgcagaagga goatgcgcto taacccccaa ccccccagga 1440

tgtacagagg aacagaaaco agaagctgag cgaotttgca ataactcttt tgattottot 1500

3/10

atcgacgaga aatgtaatgt ctgtacaag cctgacogga ttgocogatg tatgtacgag 1560
tattgcctga ggggacaaca aggattttgt gaccatgott gggagttcaa gaaagaatgc 1620
tacataaaac atggagacac totagaagta ccacctgaat gtoaaggatc cacagagccc 1680
ggcctggagg aggtggggga gattgagcag aaacagctgc agaagcggtt cgggggcttc 1740
accggggccc ggaagtoggc cgggaagttg gccaacccagg gatccgtgag caagggcgag 1800
gagctgttca cgggggtggt gcccatoctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac 1860
aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag 1920
ttcatotgca ccaccggcaa gctgcccgtg ccctggccca ccctogtgac caccttcggc 1980
tacggcctgc agtgcttcgc ccgtacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag 2040
tcgcccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac 2100
tacaagaccc gcgccgaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggatgaaccg catcgagctg 2160
aagggcatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga gtacaactac 2220
aacagccaca acgtctatat catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc 2280
aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac 2340
aoccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg ccgacaaac actacctgag ctaccagtcc 2400
gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc 2460
gccgccggga tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aa 2502

4/10

<211> 833

<212> PRT

<213> mammalian

<400> 2

Met Lys Ile Ile Ile Leu Ser Val Ile Leu Ala Tyr Cys Val Thr Asp
1 5 10 15

Asn Cys Gln Asp Ala Cys Pro Val Glu Ala Glu Pro Pro Ser Ser Thr
20 25 30

Pro Thr Val Pro Thr Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp
35 40 45

Thr Arg Cys Ala Thr Cys Lys Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys
50 55 60

Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln Tyr Val Ile
65 70 75 80

Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Tyr Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys
85 90 95

Arg Phe Asn Phe Gln Glu Pro Gly Lys Tyr Val Leu Ala Arg Gly Thr
100 105 110

Lys Gly Gly Asp Trp Ser Val Thr Leu Thr Met Glu Asn Leu Asp Gly
115 120 125

5/10

Gln Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Thr Leu Glu Val Ala Gly Asp
130 135 140

Val Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Ala Asp Pro Ile Thr Val Asn Gly
145 150 155 160

Gly Ala Asp Pro Val Ile Ala Asn Pro Phe Thr Ile Gly Glu Val Thr
165 170 175

Ile Ala Val Val Glu Ile Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe
180 185 190

Phe Lys Leu Ile Val Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile
195 200 205

Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly Leu Ile Ser Gly Ile Cys Gly Asn
210 215 220

Leu Glu Met Asn Asp Ala Asp Asp Phe Thr Thr Asp Ala Asp Gln Leu
225 230 235 240

Ala Ile Gln Pro Asn Ile Asn Lys Glu Phe Asp Gly Cys Pro Phe Tyr
245 250 255

Gly Asn Pro Ser Asp Ile Glu Tyr Cys Lys Gly Leu Met Glu Pro Tyr
260 265 270

6/10

Arg Ala Val Cys Arg Asn Asn Ile Asn Phe Tyr Tyr Tyr Thr Leu Ser
275 280 285

Cys Ala Phe Ala Tyr Cys Met Gly Gly Glu Glu Arg Ala Lys His Val
290 295 300

Leu Phe Asp Tyr Val Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr Arg Gly Thr
305 310 315 320

Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg
325 330 335

Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu Met Ala Ala Asp Cys
340 345 350

Tyr Trp Asn Thr Trp Asp Val Lys Val Ser His Arg Asp Val Glu Ser
355 360 365

Tyr Thr Glu Val Glu Lys Val Thr Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val
370 375 380

Asp Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Val Lys Val Gly Gly Val Asp Val
385 390 395 400

Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Glu Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly
405 410 415

7/10

Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe

420

425

430

Asn Phe Lys Gln Leu Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly

435

440

445

Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Ser Thr Asp Asp

450

455

460

Phe Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Ala Leu Thr Pro Asn Pro Pro Gly

465

470

475

480

Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Asn Leu

485

490

495

Phe Asp Ser Ser Ile Asp Glu Lys Cys Asn Val Cys Tyr Lys Pro Asp

500

505

510

Arg Ile Ala Arg Cys Met Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly

515

520

525

Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His

530

535

540

Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu Cys Gln Gly Ser Thr Glu Pro

545

550

555

560

8/10

Gly Leu Glu Glu Val Gly Glu Ile Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg

565

570

575

Phe Gly Gly Phe Thr Gly Ala Arg Lys Ser Ala Arg Lys Leu Ala Asn

580

585

590

Gln Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro

595

600

605

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val

610

615

620

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys

625

630

635

640

Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val

645

650

655

Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His

660

665

670

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val

675

680

685

Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg

690

695

700

9/10

Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
705 710 715 720

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
 725 730 735

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
 740 745 750

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
 755 760 765

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
 770 775 780

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser
785 790 795 800

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
 805 810 815

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 820 825 830

Lys

10/10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> mammalian

<400> 3

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Lys Arg Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly
1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> mammalian

<400> 4

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Gly Gly Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly
1 5 10 15

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> mammalian

<400> 5

Ser Glu Gln Lys Gln Leu Gln Phe Gly Gly Phe Thr Gly Gly
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15828

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K19/00, C12N15/62, C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K19/00, C12N15/62, C12Q1/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPLUS (JOIS), WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/Swissprot/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Emiko ASHIDAKA, "Tsukaku Seigyo Peptide·Nocistatin no Juyotai no Cloning Oyobi Sansei Kiko no Kaimei", Uehara Memorial Foundation Kenkyu Hokokushoshu, 2002 November, Vol.16, pages 257 to 259	1-21
X	Tomomi OTSUJI et al., "Ichibunshinai BRET ni yoru Processing Kiko eno Oyo", Seikagaku, 2002 August, Vol.74, No.8, page 1014, 4P-279	1-21
X A	WO 02/25284 A2 (Medical Research Institute of Infectious Diseases), 28 March, 2002 (28.03.02), & US 2003/077685 A1	1, 13, 15 2-12, 14, 16-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 March, 2004 (09.03.04)

Date of mailing of the international search report
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15828

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	PENNINGTON W.M. et al., Synthesis of a fluorogenic Interleukin-1 β converting enzyme substrate based on resonance energy transfer, Peptide Research, 1994, Vol.7, pages 72 to 76	<u>1,10,13,15,</u> <u>20</u> 2-9, <u>11</u> ,12, 14,16-19,21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K19/00, C12N15/62, C12Q1/37

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K19/00, C12N15/62, C12Q1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPLUS (JOIS)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

GenBank/EMBL/DBJ/Swissprot/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	芦高恵美子, 痛覚制御ペプチド・ノシスタチンの受容体のクローニング及び産生機構の解明, 上原記念生命科学財団研究報告書集, 2002 Nov., Vol. 16, p. 257-259	1-21
X	尾辻智美他, 一分子内BRETによるプロセッシング機構への応用, 生化学, 2002 Aug., Vol. 74, No. 8, p. 1014 4P-279	1-21
<u>X</u> A	WO 02/25284 A2 (Medical Research Institute of Infectious Diseases) 2002. 03. 28 & US 2003/077685 A1	<u>1, 13, 15</u> 2-12, 14, 16-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深革 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — A	PENNINGTON W. M. et al., Synthesis of a fluorogenic Interleukin-1 β converting enzyme substrate based on resonance energy transfer, Peptide Research, 1994, Vol. 7, p. 72-76	1, 10, 13, 15, 20 2-9, 11, 12, 14, 16-19, 21